第 44 卷 第 4 期
2001 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44，No.4
Nov.，2001

转双基因抗虫棉对棉铃虫的抗性

范贤林[1]，芮昌辉[1]，许崇任[2]，孟香清[1]，郭三堆[3]，赵建周[1]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所及植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100094；
2. 北京大学生命科学学院，北京 100871；3. 中国农业科学院生物技术研究所，北京 100081）

关键词：转双基因抗虫棉；Bt 棉；棉铃虫；抗虫性；杀虫晶体蛋白

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2001）04-0582-04

将苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*，Bt）杀虫晶体蛋白（insecticidal crystal protein，ICP）基因转入棉花植株中获得的抗虫棉花（下略为 Bt 棉），为棉花害虫综合防治开辟了新的途径。Bt 棉除具有丰产性、纤维品质好和对靶标害虫的良好控制作用等特性外，更重要的应用价值在于其高杀虫效果与维护生态环境的协调发展的良性作用上[1]。但研究结果已表明，害虫对 Bt ICP 的抗性适应，将严重威胁 Bt 棉的使用寿命[2]。已有的报道证明，将两种不同作用机制的杀虫基因转入植物并同时表达，不仅比转单一基因植物的抗虫性有很大提高，而且在延缓害虫抗性发展上显示出良好的应用前景[3,4]。我国继自主研制的 Bt 棉商业化应用后，转 Bt 与豇豆胰蛋白酶抑制剂（cowpea trypsin inhibitor，CpTI）的双基因抗虫棉花也已经研制成功并进入田间试验[5]。本文作者报道了转双基因抗虫棉对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 不同抗性品系的抗虫效果，以及转基因棉叶中 Bt 蛋白表达量与杀虫活性的相关性，以期为转双基因抗虫棉在害虫抗性治理中的作用评价提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 供试棉花

转 Bt/CpTI 双基因棉花“SGK-321”（简称双价棉）和转 Bt 单基因棉花“GK12”（简称 Bt 棉）含相同 Bt 基因[5]，由中国农业科学院生物技术研究所提供。常规棉花“492”（简称常规棉），为河北省市售棉种。供试棉花于 1999 年 4 月 30 日播种于中国农业科学院植物保护研究所试验田，常规栽培管理，不使用任何农药。

1.2 供试棉铃虫

1996 年 6 月下旬从河北、河南和山东 3 省 6 县（市）采集棉铃虫成虫，将其后代混合分为对照品系和抗性品系两组定向培育，前者用人工饲料常规饲养[6]，后者用转 *Cry*1A 型 Bt ICP 基因烟草汰选 18 代后，再用含 *Cry*1Ac 的 10% MVPII 水剂汰选 5 代，共汰选 23 代，与同源对照品系比较对 *Cry*1Ac 有 16 倍抗性。

1.3 测定方法

在 6 月中、6 月底、7 月底和 8 月下旬，分别采集双价棉、Bt 棉和常规棉各 20 株的顶部向下第 3 片真叶，取下每片叶中 0.4 mg 的叶片，分别用酶联免疫学测定方法（ELISA）[7]和水解 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯（BAEE）法[8]检测棉叶中 Bt ICP 和 CpTI 的表达量。叶片其余部分用 0.1% 次氯酸钠溶液消毒 5 min 后，清水冲洗并晾干，分成 3 小片分别放入直径 5 cm 的双层皿中，每皿 1 小片，接入棉铃虫 1 日龄幼虫（初孵幼虫在人

基金项目：国家“863”计划资助项目（Z17-02-02）
收稿日期：2000-09-06；接受日期：2001-02-16

工饲料中取食 1 天）3 头，每 15 头为 1 个处理，每处理 4 次重复，共 60 头。接虫后将培养皿上加保鲜膜并加盖，用橡皮筋勒紧后，置于（27±1）℃、光周期 16L∶8D 的培养箱中。处理 3 天后检查幼虫死亡率，并将存活幼虫用与上述相同方法处理的各新鲜棉叶继续单头饲养至第 6 天，检查幼虫死亡率。棉蕾的测定：采集各棉株顶部蕾（14～16 mm），每皿 1 蕾，其余处理方法和条件与棉叶相同。对不同处理间平均数的差异显著性比较采用 HSD 测验。

1.4　抗虫级别划分标准

根据杨雪梅等[9]抗虫棉棉叶室内测定分级标准：用 1 日龄幼虫测定 3 天后的校正死亡率＞60%为“特高抗”，40%～60%为“高抗”，20%～40%为“抗”，＜20%为“中抗”，与对照品系相同为“敏感”。

2　结果与分析

2.1　不同生长期双价棉和 Bt 棉叶片对棉铃虫的抗性

表 1 为两种转基因棉棉叶对棉铃虫 1 日龄幼虫的抗性测定结果。6～7 月用双价棉处理对照品系棉铃虫的校正死亡率都在 80%以上，抗虫等级均为“特高抗”；同期用 Bt 棉处理的幼虫校正死亡率为 59.1%～94%，抗虫等级处于“特高抗”和“高抗”之间。8 月下旬和 9 月上旬，双价棉的抗虫效果仍为“高抗”，而 Bt 棉则降为“抗”。

表 1　两种转基因棉棉叶对棉铃虫的抗性*

Table 1　Resistance of leaves from different transgenic cottons to *H*. *armigera* larvae

处理 Treatment	测定时间（日/月）Determined time（day /month）	1 日龄幼虫校正死亡率（%）Corrected mortality of 1-day-old larva		抗虫等级② Resistant grade	
		抗性品系 Resistant strain	对照品系 Control	抗性品系 Resistant strain	对照品系 Control
双价棉① TEG cotton	19/6	—	80.0±3.2	—	特高抗 ESR
	30/6	97.7±2.3	96.2±1.0	特高抗 ESR	特高抗 ESR
	29/7	75.5±5.8	90.2±4.9	特高抗 ESR	特高抗 ESR
	20/8	46.6±6.7	57.9±7.8	高抗 SR	高抗 SR
	10/9	—	47.3±10.4	—	高抗 SR
Bt 棉 Bt cotton	19/6	—	77.5±3.0	—	特高抗 ESR
	30/6	94.7±2.3	93.9±3.8	特高抗 ESR	特高抗 ESR
	29/7	47.9±4.6	59.1±8.8	高抗 SR	高抗 SR
	20/8	7.8±2.0	36.1±6.3	中抗 WR	抗 R
	10/9	—	33.4±7.3	—	抗 R

* 表中数据是平均值±标准误 The data in the table indicate mean ± *SE*；①The cotton with two exotic genes（Bt and CpTI）. 下表同 The same for the following tables；②ESR = extrastrong resistance，SR = strong resistance，R = resistance and WR = weak resistance

6～8 月用双价棉处理抗性品系棉铃虫的校正死亡率分别为 47%～98%，处在“特高抗”和“高抗”范围；同期用 Bt 棉处理的幼虫校正死亡率分别为 94.7%、47.9%和 7.8%，抗虫等级分别为“特高抗”、“高抗”和“中抗”。

以上结果表明，双价棉在棉花生长季节可保持“高抗”和“特高抗”的杀虫等级，杀虫效果明显高于 Bt 棉，特别是对抗性品系也可保持“高抗”以上等级。

2.2　双价棉和 Bt 棉棉蕾对棉铃虫不同抗性品系的杀虫活性

在 7、8 月份，用两种转基因棉的棉蕾分别饲养不同品系棉铃虫 3 天后，双价棉对抗性品系和对照品系

的校正死亡率差异不显著。在同一时间用 Bt 棉蕾处理的抗性品系校正死亡率显著低于对照品系（表 2）。从表 2 可以看出，双价棉棉蕾对抗性品系的杀虫活性也明显高于 Bt 棉。

表 2 转基因棉棉蕾对棉铃虫的杀虫活性（校正死亡率，%）

Table 2 Corrected mortality of *H*. *armigera* larvae feeding on buds from the transgenic cottons

测定时间（日/月） Determined time (day/month)	双价棉 TEG cotton		Bt 棉 Bt cotton	
	对照品系 Control	抗性品系 Resistant strain	对照品系 Control	抗性品系 Resistant strain
20 / 7	80.1 ± 5.4	63.3 ± 1.9	74.5 ± 8.0	43.3 ± 3.4*
18 / 8	69.8 ± 11.5	54.1 ± 4.8	60.0 ± 11.1	31.0 ± 5.7*

* 与对照品系相比，差异显著（$P < 0.05$，HSD 测验），下同

Significant difference from the control strain（$P < 0.05$，HSD）. The same for the following table

2.3 双价棉和 Bt 棉叶片对棉铃虫不同抗性品系的杀虫活性与其 Bt 蛋白表达量

用 ELISA 方法测定两种转基因棉的 Bt ICP 的表达量，结果见表 3。在同一个月份，双价棉和 Bt 棉的杀虫晶体蛋白表达量没有显著差异，且都随着棉花生长期的推进呈相似的下降趋势。杀虫活性测定结果显示，在 6 月、7 月和 8 月，棉铃虫抗性品系连续取食双价棉 6 天的校正死亡率与对照品系的校正死亡率没有显著差异。但取食 Bt 棉的抗性品系在 7 月和 8 月的校正死亡率显著低于对照品系的相应值。

从表 3 中还可看出，双价棉和 Bt 棉的杀虫活性变化趋势均与 Bt 蛋白表达量有关，即随着 Bt ICP 表达量的由多到少，杀虫活性也由高变低，但双价棉杀虫活性变化幅度比 Bt 棉小。

表 3 转基因棉叶 Bt 蛋白表达量及其杀虫活性

Table 3 Mortality of *H*. *armigera* larvae feeding on leaves from the transgenic cottons and expressing level of Bt ICP in the leaves

测定时间（日/月） Determined time (day/month)	Bt 蛋白表达量（ng/g 鲜叶） Content of Bt ICP（ng/g leaves）		校正死亡率 Corrected mortality（%）			
	双价棉 TEG cotton	Bt 棉 Bt cotton	双价棉 TEG cotton		Bt 棉 Bt cotton	
			对照品系 Control	抗性品系 Resistant strain	对照品系 Control	抗性品系 Resistant strain
29 / 6	—	982.1 ± 20.9	100	100	100	95.6 ± 4.2
15 / 7	379.1 ± 6.8	410.3 ± 10.7	96.7 ± 3.3	88.0 ± 6.8	76.9 ± 4.6	58.3 ± 4.2*
20 / 8	332.7 ± 43.3	314.2 ± 18.1	66.1 ± 6.9	56.7 ± 8.1	39.1 ± 5.0	18.8 ± 2.0*
7 / 9	40.0 ± 43.7	32.1 ± 21.4	53.3 ± 5.9	—	36.8 ± 5.6	—

用 BAEE 法测定双价棉中豇豆胰蛋白酶抑制剂（CpTI）含量，在苗期每克鲜叶的含量达 111.8 ng，并且随着棉花生长发育时间的推延有逐渐升高的趋势，而常规棉和 Bt 棉中几乎没有 CpTI 蛋白表达。这表明生物测定中双价棉对抗性品系杀虫活性显著高于 Bt 棉的结果，与双价基因共同发挥作用密切相关。

3 讨论

转 Bt 基因棉花对棉铃虫的杀虫活性随棉花的生长发育而变化，从 6 月至 8 月逐步下降[2,10]。7 月和 8 月正是田间 3 代和 4 代棉铃虫为害时期，因此抗虫棉杀虫活性的降低为害虫的取食和存活提供了机会，也增加了害虫产生抗性适应的机会。本研究结果证明，在 7 月和 8 月，双价棉对棉铃虫敏感品系和抗性品系的抗虫

效果均可分别保持“特高抗”和“高抗”水平，显示了双价棉杀虫活性的明显优势。对双价棉和 Bt 棉的 Bt ICP 和 CpTI 表达量测定结果，证明了双价棉高抗虫活性的内在基础。作者在研究转双、单基因棉对棉铃虫不同龄期幼虫的杀虫活性及其对生长发育影响的试验中还发现，双价棉在对抗性品系不同龄期幼虫杀虫活性、存活虫体重、化蛹率和羽化率等的后续影响也明显大于 Bt 棉（另文发表）。因此，双价棉在对害虫抗性治理中的应用价值，不仅在于可保持对已具有一定抗性水平的靶标害虫的高杀虫效果，还可因其同时表达两个不同作用机制的杀虫基因，使害虫对其难以产生抗性适应而延缓抗性的发展。

随着棉花生长期的推进，棉铃虫可在棉花不同器官上取食为害。有关研究结果表明，由于 Bt ICP 的表达量在抗虫棉的不同器官中存在差异[10]，因此造成转基因抗虫棉不同器官、不同部位的杀虫活性存在差异。棉铃虫在抗虫棉上取食时，可能趋向于 Bt ICP 含量较低的部位，以增加其取食、存活机会。本研究结果表明，双价棉棉蕾的杀虫活性亦显著高于 Bt 棉，此外，作者对双价棉的花和铃的杀虫活性初步测定结果表明其活性亦高于 Bt 棉，将进行进一步的系统测定，如试验结果得到验证，则双价棉各个器官将显著降低靶标害虫取食存活的机率，有利于延长 Bt 棉的使用寿命。

致谢 陈兰珍同学参加了部分生物学测定工作，特此致谢！

参 考 文 献 （References）

[1] 黄大昉. 基因工程正在开辟植物病虫害防治的新途径. 植物保护，1999，25（1）：34～36
[2] 赵建周，赵奎军，卢美光等. 华北地区棉铃虫与转 Bt 杀虫蛋白基因棉花间的互作研究. 中国农业科学，1998，31（5）：1～6
[3] 范贤林，石西平，赵建周等. 转双基因烟草对棉铃虫的杀虫活性评价. 生物工程学报，1999，15（1）：6～10
[4] 赵建周，范云六，范贤林等. 转双基因抗虫烟草延缓棉铃虫抗性适应的作用评价. 科学通报，1999，44（15）：1 635～1 639
[5] 郭三堆，崔洪志，夏兰芹等. 双价抗虫转基因棉花研究. 中国农业科学，1999，32（3）：1～7
[6] 范贤林，茹李军，魏 岑. 一种新型棉铃虫实验盒的设计与应用. 植物保护，1998，24（4）：41～42
[7] 张小四，李松岗，许崇任. 转 Bt 棉不同生长期及不同器官杀虫蛋白表达量的免疫学方法测定. 北京大学学报（自然科学版），2000，36（4）：477～484
[8] 蒋传葵，金承德，吴仁龙等编著. 工具酶的活力测定. 上海：上海科技出版社，1980. 135～137
[9] 杨雪梅，王武刚，郭予元等. 转 Bt 基因棉抗棉铃虫性的鉴定技术及其应用. 植物保护，1997，23（4）：3～5
[10] 赵奎军，赵建周，范贤林等. 我国转基因抗虫棉杀虫活性的时间动态与空间动态分析. 农业生物技术学报，2000，8（1）：49～52

Resistance of transgenic cottons expressing Bt and CpTI insecticidal protein genes to *Helicoverpa armigera*

FAN Xian-lin[1]，RUI Chang-hui[1]，XU Chong-ren[2]，MENG Xiang-qing[1]，GUO San-dui[3]，ZHAO Jian-zhou[1]

（1. Institute of Plant Protection，Chinese Academy of Agricultural Sciences，and State Key Laboratory of Biology of Plant Disease and Pest，Beijing 100094，China；
2. College of Life Science，Peking University，Beijing 100871，China；
3. Institute of Bio-technology，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100081，China）